FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1904

THÈSE

N° 275

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Jeudi 14 Avril 1904, à 1 heure

Par Louis STANKÉWITCH

Né à Kowno (Russie), le 25 août 1869

SUR UN PROCÉDÉ DE DOSAGE

DE LA

BILIRUBINE DANS LE SÉRUM SANGUIN

(Cholémimétrie de GILBERT-HERSCHER-POSTERNAK)

Président : M. GILBERT, *Professeur.*

Juges : MM. CORNIL, *Professeur.*
THIROLOIX, *Agrégés.*
MÉRY, *Agrégés.*

PARIS
G STEINHEIL, ÉDITEUR
2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1904

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen	M.	DEBOVE.
Professeurs	MM.	
Anatomie		POIRIER.
Physiologie		Ch. RICHET.
Physique médicale		GARIEL.
Chimie organique et chimie minérale		GAUTIER.
Histoire naturelle médicale		BLANCHARD.
Pathologie et thérapeutique générales		BOUCHARD.
Pathologie médicale		HUTINEL. BRISSAUD.
Pathologie chirurgicale		LANNELONGUE.
Anatomie pathologique		CORNIL.
Histologie		MATHIAS DUVAL.
Opérations et appareils		RECLUS.
Pharmacologie et matière médicale		POUCHET.
Thérapeutique		GILBERT.
Hygiène		CHANTEMESSE.
Médecine légale		BROUARDEL.
Histoire de la médecine et de la chirurgie		DEJERINE.
Pathologie comparée et expérimentale		X...
Clinique médicale		LANDOUZY. HAYEM. DIEULAFOY. DEBOVE.
Clinique des maladies des enfants		GRANCHER.
Clinique des maladies syphilitiques		GAUCHER.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale		JOFFROY.
Clinique des maladies nerveuses		RAYMOND.
Clinique chirurgicale		LE DENTU. TILLAUX. TERRIER. BERGER.
Clinique ophtalmologique		DE LAPERSONNE
Clinique des voies urinaires		GUYON.
Clinique d'accouchements		PINARD. BUDIN.
Clinique gynécologique		POZZI.
Clinique chirurgicale infantile		KIRMISSON.

Agrégés en exercice

MM.	MM.	MM.	MM.
ACHARD.	FAURE.	LEPAGE.	THIERY.
AUVRAY.	GILLES DE LA TOURETTE.	MARION.	THIROLOIX.
BEZANÇON.	GOSSET.	MAUCLAIRE.	THOINOT.
BONNAIRE.	GOUGET.	MERY.	VAQUEZ.
BROCA (Aug.).	GUIART.	POTOCKI.	WALLICH.
BROCA (André).	HARTMANN.	REMY.	WALTHER.
CHASSEVANT.	JEANSELME.	RENON.	WIDAL.
CUNEO.	LANGLOIS.	RICHAUD.	WURTZ.
DEMELIN.	LAUNOIS.	RIEFFEL, *Chef des travaux anatomiques.*	
DESGREZ.	LEGRY.	TEISSIER.	
DUPRE.	LEGUEU.		

Le Secrétaire de la Faculté : M. GRISEZ.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ou improbation.

A MA FEMME

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. le Professeur A. GILBERT

275

INTRODUCTION

La teneur en bilirubine du sérum sanguin oscille dans des limites très larges. D'un individu à un autre, suivant les moments et pour des raisons physiologiques ou pathologiques, on peut observer des variations considérables, parfois très fugaces et difficilement appréciables, mais dénotant le plus souvent des modifications organiques ou fonctionnelles de la glande hépatique. Les faits de cet ordre n'ont pas échappé à l'attention de M. le Professeur Gilbert, et il a cru qu'il serait utile d'avoir recours au dosage de la bilirubine dans le sérum sanguin pour pouvoir fixer par des données numériques toutes ces différences inaccessibles à la clinique, mais susceptibles, peut-être, d'expliquer divers symptômes constatés au lit du malade. Dans ce but, M. le Professeur Gilbert, en collaboration avec MM. les Drs Herscher et Posternak, a institué dans son laboratoire de l'hôpital Broussais une série de recherches qui ont abouti à la découverte d'un procédé clinique de dosage de la bilirubine dans le sérum, procédé très simple et suffisamment exact. Fréquentant le service de M. le Professeur Gilbert, grâce à la bienveillance de M. le Dr Herscher, nous avons été témoin des longues et patientes recherches sur la cholémimétrie. Cette question nous a vivement intéressé, et nous avons été très heureux d'accepter la proposition de M. le Pro-

fesseur Gilbert, d'exposer cette méthode et d'en faire le sujet de notre thèse inaugurale.

Le procédé de cholémimétrie de MM. Gilbert, Herscher et Posternak est basé sur ce fait que la réaction de Gmelin, caractéristique de la bilirubine, a une limite de sensibilité fixe et déterminée par ces auteurs.

Après avoir rappelé sommairement les caractères et les propriétés de la bilirubine, nous étudierons ses réactions, les procédés de recherche et de dosage de ce pigment dans les liquides organiques, connus avant les travaux de MM. Gilbert, Herscher et Posternak. Puis nous résumerons leurs travaux sur les particularités de la réaction de Gmelin dans les milieux albumineux et sur la signification de la réaction de Hayem dans le sérum sanguin, ce qui est nécessaire, nous semble-t-il, pour l'intelligence de notre exposé. Nous passerons ensuite à l'étude du procédé même de dosage dont nous essaierons de faire un exposé détaillé, et nous terminerons en indiquant un certain nombre de faits acquis grâce à ce procédé.

Mais, avant d'aborder l'étude de notre sujet, nous avons encore un devoir à remplir, celui de remercier les maîtres qui nous ont guidé dans nos études.

Tout d'abord, nous devons rendre hommage à la mémoire de notre regretté maître Dreyfus-Brisac, chez qui nous avons fait notre stage.

Nous tenons à remercier particulièrement M. le Dr Faisans, médecin de l'Hôtel-Dieu. Nous avons eu la bonne fortune de travailler chez ce maître incomparable. Nous serons toujours heureux de pouvoir nous dire son élève respectueux. En maintes circonstances, M. le

Dr Faisans nous donna des marques de son affectueuse bienveillance. Qu'il veuille bien recevoir l'hommage de notre profonde gratitude et de notre entier dévouement.

L'intérêt que M. le Professeur Pinard a daigné nous témoigner en nous réservant une place dans son service est pour nous un grand honneur, dont nous sentons tout le prix. Grâce à l'inaltérable bienveillance de ce maître, nous avons trouvé à la clinique Baudelocque le plus riche champ d'observation et la plus large facilité de travail personnel. Que M. le Professeur Pinard veuille bien croire à notre vive et respectueuse gratitude.

Nous sommes heureux de témoigner notre reconnaissance à MM. les Drs Couvelaire, Delestre et Sauvage, chefs de clinique, qui nous ont honoré de leurs bontés.

Nous remercions bien sincèrement M. le Dr Campenon, chirurgien de l'hôpital de la Charité, qui nous enseigna les principes fondamentaux de la clinique chirurgicale.

M. le Dr Cuvillier a été pour nous plus qu'un maître. Lors d'une grave maladie dans notre famille, il a prodigué ses soins affectueux, et depuis il n'a cessé de nous donner des marques de sympathie. Qu'il veuille bien croire à notre entier dévouement.

M. le Professeur Gilbert, dont nous suivons l'enseignement clinique depuis longtemps déjà, et à qui nous devons le sujet de ce travail, nous a fait un grand honneur en acceptant la présidence de notre thèse. Nous sommes vivement ému par cette marque de bienveillance à notre égard et lui exprimons notre respectueuse gratitude.

MM. les Drs Herscher et Posternak ne nous ont ménagé ni leur temps ni leurs conseils au cours de ce tra-

vail, et c'est grâce à eux que nous l'avons pu mener à bien. Notre reconnaissance leur est acquise.

Merci à M. Gery ; à son talent nous devons le croquis du cholémimètre.

CHAPITRE PREMIER

Notions préliminaires sur la bilirubine et ses dérivés.

La bilirubine, le principal des pigments biliaires, d'où proviennent tous les autres, dérive vraisemblablement de l'hématine par perte de fer et fixation d'eau :

$$\underset{\text{Hématine.}}{C^{32}\,H^{32}\,Az^{4}\,O^{4}\,Fe} + 2\,H^{2}O - Fe = \underset{\text{Bilirubine.}}{C^{32}\,H^{36}\,Az^{4}\,O^{6}}\,;$$

ce serait un isomère de l'hématoporphyrine (Nencki).

La bilirubine, généralement amorphe, se présente sous la forme d'une poudre rouge orangé, rappelant le sulfure d'antimoine, mais on peut l'obtenir aussi en cristaux de forme clino-rhombique à angles arrondis, d'un rouge foncé à reflets pourpres, ressemblant à ceux de l'acide chromique.

Elle est insoluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool et l'éther, soluble dans le chloroforme, surtout à chaud, dans le benzène, le sulfure de carbone, l'alcool amylique. Ses solutions sont jaune orangé. Le pouvoir colorant de la bilirubine est très considérable : sa solution à 1/40000 teint les tissus en jaune et à 1/500000 paraît encore colorée sous une épaisseur de 1 centimètre.

Examinées au spectroscope, les solutions de bilirubine, comme tous les colorants rouges ou jaunes, absorbent

tous les rayons du rouge au violet, et cette absorption augmente à mesure que l'on s'approche des couleurs les plus réfrangibles.

La bilirubine se comporte comme un acide monobasique faible, elle se combine avec les bases et forme des bilirubinates. Les bilirubinates alcalins sont solubles dans l'eau, insolubles dans le chloroforme ; les bilirubinates alcalino-terreux sont insolubles dans l'eau. Les bilirubinates sont décomposés par les acides forts avec mise en liberté de bilirubine.

Sous l'influence de certains agents réducteurs (amalgame de sodium, chlorure stanneux), la bilirubine fixe de l'hydrogène et de l'eau et se transforme en hydrobilirubine de Maly.

Sous l'influence des agents oxydants faibles ou exposée à l'air en couche mince, la bilirubine se transforme en biliverdine, $C^{32}\ H^{36}\ Az^4\ O^8$, le premier dérivé d'oxydation de la bilirubine, se présentant sous forme d'une poudre verte, insoluble dans l'eau, l'éther et le chloroforme, soluble dans l'acide acétique et surtout dans l'alcool.

Si l'on additionne une solution de bilirubine d'acide azotique chargé de vapeurs nitreuses, la bilirubine s'oxyde progressivement et la solution présente des changements successifs de coloration dus à la transformation de la bilirubine en pigments plus oxydés : biliverdine et autres dérivés, pigments biliprasiniques de Dastre et Floresco. Ce phénomène est connu sous le nom de *réaction de Gmelin* (1). On observe d'abord une teinte verte (forma-

(1) L'action de l'acide nitrique sur les pigments biliaires a été signalée d'une façon très nette déjà en 1725, par J.-B. Bianchi, qui dit dans son *Historia hepatica :*

Cum spiritu nitri confusa, aut cum spiritu salis acidi vulgaris, aut cum

tion de biliverdine), puis une bleue (formation de bilicyanine de Jaffé), une violette, une rouge (bilipurpurine), une orangée et enfin une jaune (par suite de la formation de cholétéline de Maly).

La *réaction de Gmelin*, la principale des réactions de coloration, caractéristiques de la bilirubine, a été décrite par Gmelin lui-même et par Tiedemann *(Recherches expérimentales, physiologiques et chimiques sur la digestion)* dans les termes suivants :

« La matière colorante de la bile, telle qu'elle existe dans ce liquide, offre des réactions extrêmement remarquables, qui n'ont pas encore été assez étudiées jusqu'à présent, mais qui la distinguent en général de toutes les matières connues. Les plus importantes sont celles qui suivent :

« Quand l'on mêle de la bile jaune de chien avec de l'acide hydro-chlorique, à l'abri du contact de l'air, par exemple dans un tube de verre renversé et rempli de mercure, il ne s'opère aucun changement de couleur, même au bout de quelques jours. Ce changement ne s'effectue que peu à peu, lorsqu'on introduit de l'oxygène ; les portions du liquide qui avoisinent le gaz se colorent en vert, et le phénomène est accompagné d'une absorption sensible de l'oxygène, qui, en peu de jours, s'élève au moins à la moitié du volume de la bile. On sait aussi que la bile mêlée avec de l'acide sulfurique, de l'acide hydro-chlorique ou de l'acide acétique, n'acquiert une couleur verte, quand on l'expose à l'air, qu'au

aceto, colorem illico ordinarium permutat in vitellinum ; hinc in viridem : cum aqua forti, bullae mox in ea viridescentes, cum tela veluti coerulea natante...

bout de quelques jours, et sans doute à mesure que la matière colorante s'oxyde.

« L'acide nitrique produit le même effet, mais d'une manière instantanée, ce qui dépend, sans doute, de ce qu'il fournit lui-même l'oxygène nécessaire pour opérer le changement de couleur. Toutes les espèces de biles, soit de mammifères ou d'oiseaux, soit de reptiles ou de poissons, que nous avons examinées sous ce rapport se sont colorées, quand nous y versions peu à peu de l'acide nitrique, d'abord en vert, puis en bleu, ensuite en violet, enfin en rouge et elles ont pris toutes ces teintes dans l'espace de quelques secondes lorsque nous ajoutions une quantité suffisante d'acide. Plus tard, au bout de quelques heures, ou, quand l'excès d'acide était plus considérable, en quelques minutes, la couleur rouge se détruisait et la liqueur devenait jaune. Ainsi la succession des teintes était la même que dans le caméléon minéral. Ce changement de couleur est d'autant plus beau que la bile est plus riche en matière colorante, et qu'elle contient moins de matière précipitable par l'acide nitrique. Cette circonstance nous a fait découvrir le principe colorant de la bile dans le sérum du sang, dans celui du chyle et dans l'urine des ictériques. Elle pourrait donc devenir importante sous le point de vue médical, puisqu'elle offre le moyen le plus sûr que nous possédions pour découvrir la présence de la bile ».

Cette réaction est simple, facile à exécuter et très commode, par conséquent, en clinique. En outre, sa valeur est considérable grâce à sa très grande sensibilité : on peut démontrer l'existence de la bilirubine dans une solution n'en contenant que 1 p. 80 000.

Cette sensibilité déjà très grande peut être augmentée si l'on substitue à l'acide nitrique le réactif de Hammarsten qui se prépare en ajoutant à 4 volumes d'alcool fort un volume d'un mélange composé de : un volume d'AzO^3H et dix-neuf volumes d'HCl, les deux acides à 25 p. 100. On ne commence à s'en servir que quand il est devenu jaune.

Le réactif de Hammarsten a une autre particularité. Si, à 2 cent. cubes de ce réactif, on ajoute quelques gouttes de la solution de bilirubine, on obtient immédiatement une coloration verte persistant indéfiniment. Si, à cette liqueur verte, on ajoute goutte à goutte le réactif, on obtient successivement toute la série des colorations de Gmelin, chacune de ces colorations se produisant pour une quantité déterminée de réactif et se conservant indéfiniment si l'on cesse d'en ajouter.

Les autres réactions de coloration caractéristiques de la bilirubine sont :

Réaction de substitution bromée de Maly. — En mélangeant les solutions chloroformiques de brome et de bilirubine, on obtient des produits de substitution bromés présentant la gamme de coloration rouge, violette, bleue, etc. (bilirubine tribromée, bibromée).

Réaction d'Ehrlich. — On fait un mélange de deux volumes du réactif d'Ehrlich qui a pour formule :

Nitrite de sodium.	0,10 centigr.
Acide chlorhydrique.....	15 c.c.
Acide sulfanilique.....	1 gr.
Eau..... q. s. pour	1 litre.

et d'un volume de la solution chloroformique de biliru-

bine. La liqueur devient trouble, mais reste rouge. On la clarifie en ajoutant un peu d'alcool ; ensuite on l'additionne de quelques gouttes d'acide acétique glacial. Il se développe une coloration violette passant au bleu intense.

Réaction de Huppert.— Si l'on précipite une solution alcaline de bilirubine avec du chlorure de calcium et de l'ammoniaque ou du lait de chaux, on obtient un précipité de bilirubinate de chaux ; si, après avoir lavé, on le met dans un tube à essai contenant de l'alcool acidifié par HCl dans la proportion de 5 p. 100 et si l'on porte à l'ébullition cette liqueur pendant un certain temps, elle devient vert émeraude ou vert bleuâtre.

Pour différencier la bilirubine d'autres pigments tels que la lutéine, on a recours à la réaction suivante :

Si l'on agite une solution chloroformique de bilirubine avec une lessive alcaline (carbonate de soude) la bilirubine passe à l'état de bilirubinate et quitte le chloroforme, qui se décolore. Si la quantité d'eau est suffisante, le bilirubinate reste dissous, mais si l'on opère avec une faible quantité d'alcali concentré, le bilirubinate se précipite.

CHAPITRE II

Procédés de recherche des pigments biliaires dans les liquides organiques.

Pour rechercher les pigments biliaires dans un liquide organique, tantôt on opère sur le liquide lui-même, tantôt sur les pigments extraits de ce liquide, qui est la plupart du temps l'urine.

Pour déceler les pigments biliaires dans un liquide organique, sans extraction préalable, on a recours le plus souvent à la réaction de Gmelin.

La meilleure manière de pratiquer cette réaction est indiquée par Frerichs dans son *Traité des maladies du foie et des voies biliaires*, où il dit :

« Le plus sûr de ces réactifs est l'acide azotique non complètement dépouillé d'acide azoteux ; il change, comme on le sait, la couleur de brun en vert, bleu, violet, rouge ; et cette dernière teinte passe définitivement au jaune sale. Ces changements s'observent avec la plus grande évidence, lorsqu'on verse, goutte à goutte et sans remuer, l'acide concentré dans un verre à pied contenant de l'urine ; les couleurs se superposent alors par couches en forme d'arc-en-ciel ».

Parmi les façons de pratiquer la réaction de Gmelin, nous devons rappeler le procédé de Rosenbach : on filtre une certaine quantité d'urine ; on étale le filtre sur le papier à filtre sec et, tandis qu'il est encore humide,

on l'humecte à l'intérieur avec de l'acide nitrique et l'on obtient tout autour la série des anneaux caractéristiques.

D'après Munk, le plus sensible de tous les procédés de recherche de la bilirubine dans l'urine serait celui de Huppert modifié par Salkowski. Cet auteur procède à la recherche des pigments biliaires de la façon suivante : on commence par alcaliniser l'urine avec quelques gouttes d'une solution saturée de carbonate de soude. Les pigments biliaires sont dissous à l'état de bilirubinates ou de biliverdinates alcalins, s'ils ne l'étaient déjà. On ajoute goutte à goutte une solution de chlorure de calcium à 1 p. 10 jusqu'à ce que la liqueur qui surnage le dépôt qui se forme n'offre plus de coloration particulière autre que celle de l'urine normale. Les bilirubinates alcalins solubles sont précipités par le chlorure de calcium à l'état de sels de chaux insolubles (1). On filtre, on lave sur le filtre le précipité et on le délaye dans un verre à réaction dans de l'alcool où il est d'ailleurs insoluble. Pour dissoudre le dépôt des sels calciques, on ajoute de l'acide chlorhydrique et l'on agite. L'acide chlorhydrique décompose les bilirubinates; il se forme du chlorure de calcium et la bilirubine mise en liberté se dissout dans l'alcool. La réaction se fait à chaud. La solution incolore présente, si l'on la porte à l'ébullition, une couleur variant du vert au bleu, s'il y avait des pigments biliaires, sinon elle reste incolore (réaction de Huppert). On laisse refroidir la liqueur et en la traitant par l'acide azotique on obtient la gamme de couleurs caractéristique de Gmelin.

(1) On peut expliquer encore la précipitation de la bilirubine par son entraînement dû à l'adhésion de ce pigment aux phosphates de chaux insolubles.

A ce propos, nous devons remarquer que l'acide nitrique concentré donne avec l'alcool un anneau vert émeraude, ce qui pourrait être, ainsi que l'ont signalé MM. Gilbert et Lereboullet, une cause d'erreur grossière dans l'appréciation de la réaction de Gmelin par le procédé de Salkowski. En réalité, il est très facile de distinguer l'anneau vert de Gmelin de la coloration obtenue par le contact de l'acide nitrique et de l'alcool. Cette dernière est beaucoup plus tardive et d'un vert émeraude plus intense que celle de Gmelin; en outre, elle apparaît au-dessous de la limite de séparation de l'alcool et de l'acide nitrique, tandis que celle de Gmelin est au-dessus (1).

Nous devons rappeler le procédé de Hedenius, qui est une variante de celui de Salkowski applicable aux liquides organiques riches en albumine, notamment au sérum sanguin. Hedenius procède de la façon suivante : Si le liquide est peu coloré et pauvre en albumine, on en prend 5 cent. cubes ; on le mélange avec 10 à 15 cent. cubes d'alcool ; il se forme un précipité ; ensuite, on ajoute dans la liqueur, goutte à goutte, de l'acide chlorhydrique à 10 ou 25 p. 100 et l'on chauffe à deux reprises jusqu'à ébullition ; la liqueur prend une coloration bleu-verdâtre plus ou moins rapidement, au bout d'une heure en général. S'il y a beaucoup d'albumine, on augmente les quantités d'alcool, on en prend 20 cent. cubes pour 5 cent. cubes du liquide albumineux et l'on filtre le précipité ; ensuite on acidifie avec précaution par 4 ou 5 gouttes d'acide chlorhydrique et l'on chauffe jusqu'à ébullition ; on obtient une teinte bleu-vert.

(1) Nous devons cette dernière différenciation à l'obligeance de M. Claude Nourrisson.

Un des procédés les plus sensibles est celui de Hammarsten. Cet auteur procède par l'extraction. On place 10 cent. cubes d'urine neutre ou légèrement acide dans un tube centrifugeur, on ajoute une petite quantité de chlorure de baryum (1) et l'on soumet à la centrifugation pendant quelques minutes ; on décante le liquide surnageant, on délaye le dépôt dans 1 cent. cube de réactif de Hammarsten (p. 12) et l'on centrifuge de nouveau. On obtient de cette façon une belle solution verte, si l'urine renferme des pigments biliaires ; cette liqueur peut être transformée en bleu, en violet, en rouge, en jaune, si l'on augmente la quantité de réactif. La coloration verte s'obtiendrait même si l'urine ne contenait que 1 p. 500 000 à 1 p. 1 000 000 de bilirubine.

Avant de terminer cette énumération, nous avons à mentionner encore le procédé décrit par E. Maréchal et H. Rosin. Il est basé sur le fait, observé par Maly et utilisé en clinique déjà par Trousseau, que l'iode en solution alcoolique exerce une action oxydante sur la bilirubine. On opère de la manière suivante : dans un tube à essai contenant l'urine à analyser et tenu très incliné, on fait arriver au moyen d'une pipette, le long de la paroi, 2 à 3 cent. cubes d'une solution alcoolique de teinture d'iode officinale à 10 p. 100. Très rapidement il se développe à la limite de séparation des deux liquides un anneau d'une belle couleur verte, qui peut persister plusieurs heures, si l'urine à examiner renferme des pigments biliaires.

(1) En présence d'une grande quantité de matières colorantes, le chlorure de calcium est préférable.

Quand il s'agit de rechercher les pigments biliaires dans le sérum sanguin, on peut avoir recours à la méthode de von Jaksch ou à celle de Hedenius.

Von Jaksch, ayant soustrait au malade 10 à 14 cent. cubes de sang, le laisse reposer une demi-heure à 1 heure et filtre le sérum obtenu sur de l'amiante. Ensuite il le porte dans une éprouvette étroite à une température de 78-80° C de manière à le faire coaguler. Le sérum ne contenant pas de bilirubine est lactescent et coloré en jaune clair, s'il en contient, il prend une teinte verdâtre. Si l'on chauffe de nouveau ce dernier, on obtient avec une température de 50-60° C, suivant la quantité de bilirubine, une coloration vert gazon plus ou moins intense (intensive grasgrüne Farbe).

Hedenius se sert de la réaction de Huppert. Cet auteur prend 3 à 4 cent. cubes de sérum et les mêle avec 15 à 20 cent. cubes d'alcool, ensuite il filtre, ajoute au liquide filtré goutte à goutte de l'HCl à 10 p. 100 (5 gouttes pour 10 cent. cubes de liquide en cas de coloration moyenne du sérum à examiner) et le porte à l'ébullition à deux reprises. La présence de bilirubine se manifeste par une teinte bleu vert qui apparaît de suite ou au bout d'une heure. Ce procédé est plus simple, plus prompt et plus démonstratif que celui de von Jaksch. Il se prête bien à l'étude du sérum des ictériques. Sa limite de sensibilité, d'après Hammarsten, serait à 1 p. 50 000.

La plupart du temps on ne s'adresse qu'à la réaction de Gmelin.

Mya imitant le procédé de Rosenbach fait simplement venir au contact, sur une soucoupe blanche, une goutte de sang et une goutte d'acide nitrique nitreux.

M. le Professeur Hayem conseille d'opérer dans un tube très étroit, ou de coaguler d'abord l'albumine par la chaleur, d'épuiser le coagulum par un mélange d'alcool et de chloroforme, de filtrer et soumettre le filtrat à l'action de l'acide nitrique nitreux.

Mais, l'addition d'acide nitrique nitreux au sérum sanguin donne naissance à la réaction de Gmelin, telle qu'elle est décrite par Gmelin et Frerichs, seulement dans quelques cas exceptionnels de cholémie intense, même si l'on opère dans un tube étroit. D'ordinaire, il ne se produit, dans ces conditions, qu'un liseré bleu. Nous aurons l'occasion de revenir longuement sur ce point en parlant des particularités de la réaction de Gmelin dans les milieux albumineux, mais nous le signalons dès maintenant.

Quand on dispose d'une grande quantité de sérum, on peut, comme l'ont montré MM. Gilbert et Herscher, pratiquer la réaction, non plus dans un tube de faible calibre, mais dans un large verre conique, après avoir dilué le sérum de son volume d'eau. On opère alors, comme sur l'urine, et, mieux que dans ce liquide, on note la formation des anneaux caractéristiques. Non seulement ceux-ci apparaissent plus nettement que dans l'urine, mais encore, si l'on n'ajoute pas trop d'acide, et si l'on empêche de la sorte sa trop rapide diffusion, ils demeurent visibles pendant un temps considérable.

CHAPITRE III

Procédés de dosage de la bilirubine.

Les méthodes de dosage de la biliburine dans les liquides organiques sont peu nombreuses.

Nous devons citer tout d'abord celle de Stadelmann qui consiste dans la pesée des pigments isolés.

On traite l'urine par du lait de chaux ; la bilirubine précipite sous forme de bilirubinates calciques insolubles ; on lave le précipité obtenu jusqu'à décoloration de l'eau de lavage ; on le sèche, on le broie dans un mortier et on l'additionne d'une petite quantité de HCl, de manière qu'il persiste une faible réaction alcaline. Pour débarrasser le précipité des phosphates, on le lave de nouveau jusqu'à décoloration de l'eau de lavage, on le dessèche, on le pulvérise et enfin on le traite à chaud par du chloroforme additionné d'un peu de HCl. La bilirubine est mise en liberté et se dissout dans le chloroforme. On distille celui-ci, on lave le précipité à plusieurs reprises avec de l'éther et l'on obtient des cristaux de bilirubine, qui sont ensuite séchés et pesés.

Cette méthode est bien applicable aux liquides tels que l'urine, mais le sérum sanguin est très riche en matières albuminoïdes pour lesquelles les pigments biliaires possèdent une très grande affinité et dont ils ne peuvent pas être séparés complètement, d'où déjà une

première difficulté. De plus, les quantités de sérum sanguin, dont on dispose généralement en clinique, sont trop faibles pour qu'on puisse même tenter un pareil isolement, l'extraction et la purification de la bilirubine étant des opérations très délicates.

Une autre méthode, celle proposée en 1894 par Adolf Jolles, est basée sur le fait, observé par R. Maly, de la transformation de la bilirubine en biliverdine par l'iode et les autres halogènes. La solution alcoolique d'iode constitue un agent d'oxydation graduée et faible qui transforme complètement la bilirubine en biliverdine, sans toutefois dépasser ce terme. La réaction a lieu d'après l'équation :

$$\underset{\text{Bilirubine}}{C^{32}\,H^{36}\,Az^{4}\,O^{6}} + 4I + 2H^{2}O = \underset{\text{Biliverdine}}{C^{32}\,H^{36}\,Az^{4}\,O^{8}} + 4HI$$

suivant laquelle 508 d'iode correspondent à 572 de bilirubine, c'est-à-dire que 1 cent. cube de la solution alcoolique d'iode centi-normale (1 gr. 27 d'iode pure sublimée pour 1000 d'alcool à 96°) correspond à 1,43 milligr. de bilirubine. La fin de la réaction est indiquée par la coloration verte de la liqueur, par les caractères spectroscopiques de la biliverdine, par l'invariabilité de la teneur en iode. En déterminant la différence entre la quantité d'iode ajoutée et celle qui reste en excès, on peut facilement calculer la quantité de bilirubine oxydée.

Jolles opère sur la bilirubine en solution chloroformique. On introduit dans un tube approprié 5 cent. cubes de chloroforme, 5 à 25 cent. cubes d'urine filtrée, 10 cent. cubes d'une solution de chlorure de baryum à 20 p. 100,

2 cent. cubes d'acide sulfurique à 2 p. 100 et l'on ajoute de l'eau jusqu'à ce que le volume total soit de 50 cent. cubes. On agite le mélange pendant 5 minutes et l'on décante le chloroforme, dans lequel la bilirubine est dissoute. On ajoute au chloroforme la solution alcoolique centi-normale d'iode, goutte à goutte et en agitant. La liqueur devient verte. On note la quantité d'iode employée ; reste alors à déterminer la quantité d'iode ajoutée en excès. Pour cela on se sert, comme dans le procédé d'iodimétrie, de la solution centi-normale d'hyposulfite de soude cristallisé (2 gr. 48 p. 1000 d'eau), dont 1 cent. cube correspond à 1 milligr. 27 d'iode. Pour faire agir cette solution aqueuse sur la liqueur chloroformo-alcoolique, on additionne celle-ci de 10 cent. cubes de la solution d'iodure de potassium à 1 p. 10 et de 100 cent. cubes d'eau. Après avoir additionné la solution d'hyposulfite de soude de 3 à 4 cent. cubes de liqueur d'amidon à 1 p. 100, on verse la liqueur chloroformo-alcoolique iodurée d'iode dans une quantité déterminée d'hyposulfite de soude jusqu'à production de la coloration bleue d'iodure d'amidon (1). D'après la quantité d'hyposulfite employée on calcule facilement la quantité d'iode libre contenue dans la solution alcoolique iodurée. On sait ainsi la différence d'iode employée et d'iode restée en excès, et un calcul très simple permet d'obtenir la quantité de bilirubine.

Cette méthode, outre sa complexité, a été fort discutée, notamment par Thudichum. Les principales objections

(1) Si la quantité de solution alcoolique d'iode employée dépasse 10 cent. cubes, il faut recommencer la recherche avec moins d'urine, l'iodure d'amidon n'étant pas visible dans la liqueur fortement colorée en vert.

de cet auteur sont que la bilirubine ayant servi à l'élaboration de la méthode de Jolles était très impure, que l'équation de Jolles, d'après laquelle tant d'iode correspond à tant de bilirubine n'est pas exacte, qu'enfin le spectre décrit par Jolles n'est pas celui de la biliverdine et en diffère notablement. Aussi le dosage de Jolles ne peut-il pas être considéré comme rigoureux et, même en le supposant parfait, son procédé ne saurait donner aucun résultat dans le sérum, l'iode étant en solution alcoolique et l'alcool précipitant les albuminoïdes.

Etant donnée la difficulté d'application de ces méthodes au sérum sanguin, MM. Gilbert, Herscher et Posternak avaient pensé tout d'abord avoir recours à une méthode colorimétrique. Le procédé bien connu de MM. Gautier et Arthus, qui précipitent les pigments biliaires dans l'urine par le sous-acétate de plomb, traitent le précipité plombique par de l'acide chlorhydrique, épuisent la masse par le chloroforme et comparent cette liqueur avec un type coloré qu'on étend plus ou moins de chloroforme pur, est complètement inapplicable au sérum. Mais la bilirubine, ainsi qu'il résulte des recherches exposées dans les chapitres suivants, étant, chez l'homme et chez tous les mammifères, la matière tinctoriale principale, sinon unique, du sérum convenablement récolté, on pouvait penser *a priori* que l'examen direct de la coloration du sérum sanguin pourrait permettre de déterminer la teneur de ce liquide en pigments biliaires.

Les essais entrepris à ce sujet au laboratoire de l'hôpital Broussais ont montré très rapidement que ce n'est pas par cette voie qu'on pouvait arriver à la solution du problème du dosage de la bilirubine dans le sérum. En

effet, le procédé colorimétrique présente de grandes difficultés et expose à des erreurs considérables. Quel que soit le procédé de prise du sang, le sérum, fût-il récolté dans les meilleures conditions, renferme toujours une petite quantité d'hémoglobine dissoute ; quelquefois d'ailleurs, les modifications pathologiques du sang ne permettent pas d'obtenir un sérum autrement que contenant beaucoup d'hémoglobine. Or, la teinte hémoglobinique masque et simule à la fois la teinte bilirubinique. De plus, les sérums sont parfois opalescents (néphrites, cachexie prononcée etc.) ; dans ces cas, encore, la colorimétrie est inapplicable, car on est exposé à de grossières erreurs, l'opalescence diminuant la coloration. Ce fait est facile à vérifier expérimentalement. Si, à deux sérums artificiels, on ajoute une même quantité de bilirubine et si l'on rend l'un d'eux opalescent, celui-ci paraît beaucoup moins jaune.

Ayant constaté l'impossibilité d'appliquer la méthode colorimétrique au dosage de la bilirubine dans le sérum sanguin, MM. Gilbert, Herscher et Posternak ont essayé d'utiliser dans ce but la réaction de Gmelin et ont repris son étude dans les milieux albumineux. Les recherches qu'ils ont faites dans le laboratoire de l'hôpital Broussais ont abouti à l'élaboration de la méthode actuelle et feront l'objet des chapitres suivants.

CHAPITRE IV

Particularités de la réaction de Gmelin dans les milieux albumineux. Réaction de Hayem.

Quand la réaction de Gmelin est pratiquée dans un liquide non albumineux, dans la bile ou l'urine par exemple, c'est l'*ensemble* et la *succession* des teintes, comme nous l'avons vu précédemment, qui sont caractéristiques de la bilirubine. Quant il s'agit d'un milieu albumineux, comme le sérum sanguin, cette réaction est sensiblement différente et présente quelques particularités très importantes à connaître.

Si, dans un tube étroit, on dépose une certaine quantité de sérum sur de l'acide nitrique, la réaction se produit de la manière décrite par M. le Professeur Hayem en ces termes :

« A la limite de séparation de deux liquides, l'albumine du sérum se coagule et, au fur et à mesure que l'acide nitrique monte par diffusion, le caillot s'élève et s'accroît progressivement, jusqu'à ce que, au bout d'une demi-heure à une heure, le sérum soit pris en masse. La réaction de Gmelin n'apparaît pas d'emblée ; il faut attendre de 3 à 10 minutes avant de se prononcer. Le caillot d'abord blanc, jaunit rapidement à la partie inférieure par suite de l'oxydation due à l'acide nitrique. Quand la réaction de Gmelin commence à apparaître,

c'est immédiatement au-dessus de la partie jaunâtre que le liseré caractéristique se produit. Ce liseré forme sur le caillot un petit anneau fin, de coloration bleuâtre avec reflet verdâtre ».

Il ne s'agit donc pas ici de la *succession des nuances* décrite par Gmelin et Tiedemann, ni de la *série des anneaux* indiquée par Frerichs, mais d'*un petit anneau fin, de coloration bleuâtre avec reflet verdâtre*, siégeant immédiatement au-dessus de la partie jaune du caillot. En présence de ce fait, on était en droit de se demander si le liseré bleu avec reflet verdâtre est bien attribuable à la bilirubine ou, en d'autres termes, si la réaction de Hayem dans le sérum a la même signification que la réaction de Gmelin dans l'urine. Cette question était d'autant plus légitime que, dans les cas où le sérum renferme indiscutablement des pigments biliaires en quantité notable, comme dans les cas d'ictère intense, au cours, par exemple, d'une obstruction du canal cholédoque, l'acide nitrique produit dans le coagulum albumineux, non plus seulement un liseré bleu verdâtre, mais la série complète des anneaux caractéristiques de Gmelin et Frerichs.

C'est précisément dans le but de répondre à cette question que MM. Gilbert, Herscher et Posternak ont repris l'étude de la réaction de Hayem en se servant pour leur étude de milieux albumineux artificiels contenant en solution des quantités variables de bilirubine cristallisée.

Dès le début de leurs recherches, ces auteurs ont remarqué que l'intensité de la réaction de Gmelin dans les milieux albumineux est sous la dépendance de plusieurs

facteurs, qu'elle varie, notamment, suivant la composition du réactif employé, suivant le calibre du vase dans lequel cette réaction est pratiquée, suivant, enfin, le moment où l'observation est faite. Aussi ont-ils adopté, après de nombreux essais et pour avoir des résultats comparables, une technique uniforme, des milieux et des réactifs déterminés.

Ils ont utilisé un sérum artificiel, constitué par de l'eau salée tenant en solution de l'albumine d'œuf et additionnnée d'une faible quantité de soude caustique, suivant la formule :

Blancs d'œufs.....	*a â.*
Eau salée à 15 p. 1000.....	
Soude caustique.....	5 p. 1000.

Ainsi composé, ce sérum artificiel se rapproche sensiblement du sérum sanguin, tant par sa teneur en albumine et son alcalinité que par sa fluidité. Il est absolument incolore, sous une épaisseur de 1 centimètre. Quand on le traite par l'acide azotique, il se coagule ; le caillot, d'abord blanc, jaunit bientôt au contact de l'acide, par suite de la réaction xanthoprotéïque ; peu à peu, cette teinte jaune progresse de bas en haut. Mais, au niveau de l'union des zones blanche et jaune, aucun phénomène coloré n'apparaît, il n'existe pas d'anneau bleu notamment.

Leurs solutions de bilirubine étaient obtenues par addition de bilirubine cristallisée à du sérum albumineux artificiel dans la proportion de 1 p. 1000 et 1 p. 5000. Ces solutions s'altérant rapidement, devaient être préparées et employées extemporanément.

L'acide nitrique nitreux avait pour formule : deux vo-

lumes d'AzO^3H pour un volume d'H^2O additionnés d'une petite quantité de nitrite de soude.

Voulant ajouter à des volumes de sérum albumineux artificiel exactement mesurés à l'aide de pipettes graduées des quantités déterminées de solutions de bilirubine et pratiquer sur les dilutions ainsi obtenues la réaction de Gmelin, ils ont employé la méthode suivante :

Au fond de tubes mesurant exactement un centimètre de diamètre, on place un quart de centimètre cube de réactif nitrique nitreux à la surface (1) duquel on dépose, avec précaution et sans agiter, un demi centimètre cube environ de sérum albumineux artificiel dans lequel on a fait une dilution déterminée de solution de bilirubine. L'observation est faite après une demi-heure (2) de repos.

Les résultats de ces essais ont été consignés dans une communication à la Société de Biologie de Paris (séance du 2 Mai 1903), où nous lisons :

« Une solution (3) de bilirubine à 1/350000, solution la plus faible que nous ayons étudiée, présente déjà une nuance jaunâtre, extrêmement légère, mais appréciable par comparaison avec le sérum artificiel pur.

(1) On peut procéder encore d'une autre façon : On peut déposer dans le tube le liquide albumineux le premier et introduire ensuite à l'aide d'une pipette à bout effilé le réactif nitrique ; l'acide azotique ayant une densité plus grande reste au fond du tube et le liquide albumineux remonte au-dessus de lui.

(2) Dans leur communication à la Société de Biologie, MM. Gilbert, Herscher et Posternak ont indiqué comme limite une heure, mais les observations ultérieures ont montré que la réaction se produit au bout d'une demi-heure au plus tard.

(3) La préparation de la bilirubine chimiquement pure présente des difficultés considérables, aussi ne donnons-nous pas ces chiffres comme absolus ; nous les considérons cependant comme très voisins de la vérité (Note des auteurs).

« De 1/350000 à 1/55000 le réactif de Gmelin ne donne naissance à aucun phénomène coloré.

« De 1/55000 à 1/40000, on observe une ombre légère, visible seulement par comparaison avec les tubes précédents.

« C'est seulement à 1/40000 que l'anneau bleu décrit par M. Hayem, mais présentant toutefois un reflet violet et non pas vert, devient visible nettement pour un œil exercé par l'étude des modifications progressives observées dans les tubes précédents.

« Ce degré de concentration constitue, dans les conditions où nous nous sommes placés, la *limite de la sensibilité* de la réaction de Gmelin. Dans les tubes de 2 à 3 millimètres employés par M. Hayem, la réaction demeure encore négative.

« De 1/11000 à 1/7000, on constate un liseré bleu avec reflet verdâtre *(Réaction de Hayem)*.

« De 1/7000 à 1/3500 deux anneaux bleu et vert, accolés l'un à l'autre et mesurant ensemble 1 millimètre à 1 millimètre 1/2 de hauteur.

« Enfin, à 1/3500 environ et au-dessus, apparaissent en outre les anneaux violet et rose ».

MM. Gilbert, Herscher et Posternak ont exécuté encore une expérience inverse en diluant un sérum ictérique où s'observait la réaction de Gmelin complète.

Ayant fait deux séries de dilutions : l'une avec leur sérum artificiel, l'autre avec du sérum de lapin, qui se comporte vis-à-vis du réactif nitrique nitreux comme le sérum artificiel, ils ont vu que, au fur et à mesure qu'ils ont augmenté la dilution de ces deux séries, les anneaux colorés de Gmelin disparaissaient progressivement et

dans un ordre déterminé. Les anneaux rose et violet s'effaçaient les premiers, puis l'anneau vert, finalement l'anneau bleu faiblissait et devenait invisible.

Nous basant sur ces faits, nous pouvons conclure :

1° La réaction produite par l'acide nitrique nitreux dans les milieux albumineux est la plupart du temps distincte de celle qu'ont décrite Gmelin et Frerichs ; la série des anneaux colorés de Gmelin n'apparaît dans un milieu albumineux sous l'influence de l'acide nitrique que si la teneur en bilirubine de ce liquide atteint une concentration déterminée. Dans les conditions des expériences précitées, cette série des anneaux colorés apparaît seulement quand la concentration de bilirubine atteint ou dépasse 1 p. 3 500 ; si cette concentration est inférieure à 1 p. 7 000, l'anneau bleu seul est assez intense pour se détacher nettement sur le coagulum albumineux ; enfin, si la concentration de bilirubine est inférieure à 1 p. 40 000, le réactif nitrique nitreux ne révèle plus la présence de ce pigment dans le sérum albumineux ;

2° La réaction de Gmelin, pour sensible qu'elle soit, n'est pas absolue ; elle demeure négative au-dessous d'une certaine limite et, par conséquent, elle ne saurait donner d'indication quand la concentration de la bilirubine dans un milieu albumineux n'atteint pas ce chiffre.

3° La limite de la sensibilité de cette réaction correspond à une concentration de bilirubine fixée avec une très grande approximation à 1 p. 40 000, si l'on opère dans les conditions indiquées précédemment, (conditions des réactifs, du calibre du vase, du moment d'observation).

Cette dernière déduction est pour nous la plus inté-

ressante. *La réaction limite de Gilbert-Herscher-Posternak*, apparaissant toujours avec la même concentration de 1 p. 40 000 et étant par conséquent fixe et constante, peut devenir la base d'un procédé de dosage. Il suffit, en effet, par des dilutions successives, de ramener la teneur en bilirubine d'un sérum quelconque à cette concentration fixe, donnant la réaction limite, pour pouvoir calculer d'après le degré de la dilution la teneur initiale. Mais, avant d'appliquer ces données au sérum sanguin, il s'agit de savoir si la réaction limite de Gilbert-Herscher-Posternak, comme celle de Hayem, est imputable à la bilirubine seule et si ce sérum ne renferme pas d'autres substances colorantes pouvant donner les mêmes réactions. Nous nous occuperons de ce point dans le chapitre suivant.

CHAPITRE V

Signification de la réaction de Hayem dans le sérum sanguin.

D'une part, ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'acide nitrique nitreux, dans les conditions, indiquées, fait naître dans un sérum albumineux artificiel additionné de bilirubine dans des proportions comprises entre 1/40000 et 1/7000 un liseré bleu ; c'est la *réaction de Hayem*.

D'autre part, cette même réaction s'observe fréquemment dans le sérum de l'homme et presque constamment dans celui du bœuf, du cheval, de la poule, du pigeon et du canard.

Le sérum sanguin renfermant un certain nombre de matières colorantes autres que la bilirubine, il est nécessaire, pour affirmer que cette réaction est bien caractéristique de la bilirubine, de démontrer qu'elle est attribuable uniquement à la présence de bilirubine et que les autres substances colorantes ne peuvent pas donner une réaction analogue.

MM. Gilbert, Herscher et Posternak ont étudié, à ce point de vue, les différentes matières colorantes qu'on peut rencontrer dans le sérum et ont discuté à fond cette question devant la *Société de Biologie* de Paris, dans la séance du 9 mai 1903.

Les matières colorantes du sérum, qu'on pourrait incriminer *a priori* dans la production du liseré bleu sous l'influence de l'acide nitrique nitreux, sont au nombre de quatre : albumine, hémoglobine, indican, enfin et surtout lutéine. Nous allons passer en revue ces substances, et nous essayerons, en nous basant sur des faits rapportés dans la communication que nous venons de citer, de démontrer successivement pour chacune d'elles qu'en réalité elles ne jouent aucun rôle dans la production du liseré bleu de Hayem.

L'albumine, sous l'influence de l'acide nitrique, ne se colore qu'en jaune, ce qui constitue la réaction xantho-protéïque. Mais, l'albumine donnant, sous l'influence de l'acide chlorhydrique, la réaction de Caventou et d'Adamkiewicz (teinte bleu violet) et le sérum sanguin renfermant toujours du chlorure de sodium, on pourrait facilement supposer que ce sel, en présence de l'acide nitrique, donne naissance à de l'acide chlorhydrique libre, auquel serait imputable la production de l'anneau bleu de Hayem. Cette hypothèse est facilement réfutable. Il nous suffit de rappeler qu'on n'observe pas la présence de l'anneau bleu dans le sérum albumineux artificiel, ni dans les sérums hypoteintés de l'homme. Et pourtant ces sérums renferment la même quantité de chlorure de sodium que les sérums ordinaires ou hyperteintés, présentant l'anneau bleu quand on les traite par l'acide nitrique.

Une objection plus sérieuse pourrait être faite à propos de l'hémoglobine. D'une part, la bilirubine, isomère de l'hématoporphyrine, dérive vraisemblablement, suivant Nencki, de l'hématine, et pourrait même se former

aux dépens de l'hémoglobine dans les anciens foyers hémorragiques, ainsi qu'il résulte des travaux de Breschet, Virchow, Robin, Zenker, Funke, Jaffé, Hayem, etc. D'autre part, l'hématoïdine subirait, d'après Gubler, des modifications de couleur entièrement comparables à celle de la bilirubine sous l'action de l'acide nitrique. On pourrait, donc, avec toute vraisemblance, incriminer l'hémoglobine dans la production du liseré bleu de Hayem, d'autant plus que le sérum sanguin, quoique contenant cette substance en minime proportion, à l'état normal, n'en est jamais exempt.

Pour vérifier cette hypothèse, MM. Gilbert, Herscher, et Posternak ont fait des solutions diversement concentrées d'hémoglobine dans leur sérum albumineux artificiel ; ils les ont traitées par le réactif nitrique. A aucun degré de concentration ils n'ont observé l'apparition de l'anneau bleu ; en tout et pour tout, le coagulum albumineux présentait une coloration grisâtre.

Ces auteurs ont fait une expérience analogue avec l'indican ou indigogène de Thudichum, bien qu'on n'ait jamais signalé, à notre connaissance, ce corps dans le sérum sanguin. La substance chromogène, désignée sous le nom d'indican, n'est autre que l'indoxylsulfate de potassium contenant des traces de combinaison d'indoxyl avec l'acide glycuronique (Schmiedeberg). Elle se présente sous forme de lamelles blanches, nacrées, solubles dans l'eau ; oxydée au sein de l'eau, elle donne naissance à l'indigo bleu ; quand l'oxydation se fait à chaud par l'acide nitrique, il se forme du rouge d'indigo (réaction de Rodenbach). Sa présence dans l'urine peut être une cause d'erreur dans l'appréciation de la réaction de

Gmelin : la coloration bleue se superposant à la teinte jaune de l'urine donne l'impression du vert. Il a donc paru utile de rechercher si l'anneau bleu s observant dans le sérum ne pouvait pas être produit par l'indican. En traitant, par l'acide nitrique nitreux, le sérum albumineux artificiel additionné de quantités diverses d'une urine riche en indican, mais dépourvue des pigments biliaires, on a observé que, si ce sérum renfermait peu d'indican, le coagulum prenait dans son ensemble une teinte rose. S'il en contenait beaucoup, un liseré rouge sale, assez intense, apparaissait nettement sur le fond rose du coagulum et au-dessus de la zone jaune. On n'a jamais constaté le moindre reflet bleu.

La dernière des substances incriminables dans la production du liseré bleu dans le sérum sous l'influence de l'acide nitrique est la lutéine. Celle-ci fait partie du groupe des pigments jaunes, jaunes verdâtres et rouges qu'on trouve dans le règne animal et dans le règne végétal et qui portent le nom générique de lipochromes. Ce sont des substances non complètement encore étudiées et sur lesquelles les divers auteurs sont loin d'être d'accord.

D'après Thudichum, la lutéine est une matière colorante jaune, existant dans le sérum sanguin, comme dans divers tissus animaux et végétaux, cristallisable, facilement soluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme ; ses solutions présenteraient trois bandes d'absorption : dans le bleu, l'indigo et le violet ; sous l'influence de l'acide nitrique concentré, ses cristaux prendraient une teinte bleue très fugace. Mais, cette substance n'a pu être isolée jusqu'à présent qu'en partant des corps jaunes de l'ovaire et de quelques produits végétaux (carotine

d'Arnaud). D'après Thudichum, lui-même, cette substance possède une telle affinité pour l'albumine, que son extraction du sérum présente des difficultés extrêmes.

Nombre d'auteurs se sont occupés de la question depuis et ont cherché à résoudre le problème par l'analyse spectrale ; mais les faits rapportés par eux sont trop contradictoires pour qu'on puisse donner une conclusion ferme. Pribram a observé un effacement de la partie droite du spectre dans le sérum de cheval ; Maly a trouvé un spectre analogue dans le sérum de bœuf et a conclu à l'existence de l'urobiline ; Krukenberg a vu, dans le même sérum, deux bandes analogues à celles produites par le pigment cutané du *Triton cristatus* et différentes de celles de la lutéine de Thudichum ; Krukenberg, après avoir isolé par l'alcool amylique cette substance colorante, a constaté qu'elle se teint en bleu sous l'influence de l'acide nitrique. Mac Munn a noté dans le sérum de mouton une seule bande sur la ligne F de Frauenhofer, mais plus rapprochée du rouge que celle de la lutéine, et il a conclu que cette bande doit être attribuée à un produit d'oxydation des pigments biliaires. Hallibürton a décrit dans le sérum des oiseaux une substance colorante, différente de celle de Krukenberg : elle s'extrait par l'alcool ordinaire, se teint par l'acide nitrique fumant, très passagèrement, en vert et donne une seule bande d'absorption entre λ 475 et λ 500 avec un léger obscurcissement à droite de cette bande.

MM. Gilbert, Herscher et Posternak partant de cette idée que, si la matière colorante de tous les sérums était la même, l'examen spectroscopique de ceux-ci chez différents animaux devrait donner des résultats identiques,

pour peu que sous une épaisseur déterminée ils présentassent une coloration semblable, ont fait l'expérience suivante.

D'une part, grâce à des dilutions convenables avec leur sérum artificiel, ces auteurs ont ramené à une même teinte des sérums d'homme, de cheval, de bœuf, de pigeon, de poule et de canard. D'autre part, ils ont préparé une solution de bilirubine pareillement colorée, qui correspondait à la concentration de 1 p. 34 000. L'examen spectroscopique de ces solutions, sous une épaisseur de 1 centim., a permis de constater les phénomènes suivants :

« Les sérums d'homme, de cheval, de bœuf et la solution de bilirubine présentaient un spectre se rapprochant de celui décrit par Pribram. Il y avait un obscurcissement à partir de 124 (la raie du Na correspondant à 90 et celle du Li à 68,5). Les sérums des gallinacés, par contre, montraient, très accusées sur un fond obscur, deux bandes, de 126 à 135 et de 148 à 160 ». En augmentant la dilution par addition à ces sérums isochromes d'un volume de sérum artificiel, en rendant par conséquent la concentration de la bilirubine inférieure à la limite de la sensibilité de la réaction de Gmelin, ces auteurs ont noté que l'obscurcissement du spectre diminuait chez les mammifères, tandis que la bande du sérum des gallinacés persistait très nettement. « Si donc le lipochrome était capable de donner naissance à l'anneau bleu, il ne le produirait qu'à un degré de concentration marquée, alors que la bande est très accusée. Or, cette bande manquant dans les sérums des mammifères, la lutéine, s'ils en contenaient, serait en quantité insuffisante pour produire un liseré bleu ». Chez les oiseaux, la lutéine, si abondante dans

leur sérum, ne peut pas être incriminée non plus dans la production du liseré bleu, puisqu'elle se teint en vert par l'acide nitrique (Halliburton) et non pas en bleu ; d'ailleurs l'intensité de la réaction de Gmelin dans les sérums d'oiseaux, à l'inverse du fait observé chez les mammifères, n'est nullement proportionnelle à celle de leur teinte.

Ainsi, puisqu'aucune des substances colorantes que nous venons de passer en revue, la lutéine, pas plus que l'albumine, l'hémoglobine et l'indican, n'est capable de donner naissance sous l'influence de l'acide nitrique à la réaction de Hayem, force est d'admettre que *la production de l'anneau bleu doit être attribuée à la bilirubine.*

En faveur de cette manière de voir, plaident encore des considérations d'un autre ordre. Hammarsten considère notamment les pigments biliaires comme une partie constituante du sérum du cheval, d'où il a pu isoler la bilirubine cristallisée 17 fois sur 20.

De plus, au cas où il existe un anneau bleu dans le sérum, dans les conditions indiquées précédemment, on pourrait obtenir la série complète des anneaux de Gmelin ; il suffirait, à condition que la bilirubine ne soit pas en trop faible quantité, de diluer une grande quantité de sérum d'un ou de deux volumes d'eau et de pratiquer la la réaction sur cette dilution dans un verre à expérience.

La question posée par nous à la fin du chapitre précédent nous paraît donc tranchée. *Le liseré bleu, provoqué dans le sérum sanguin par l'acide nitrique nitreux, si léger soit-il, est caractéristique, de la présence de la bilirubine.* Nous pouvons, par conséquent, passer à l'exposé de notre procédé de dosage.

CHAPITRE VI

Cholémimétrie

Principe de la méthode. — Les faits exposés dans les chapitres précédents nous ont montré que, d'une part, dans le sérum albumineux artificiel renfermant de la bilirubine et traité par l'acide nitrique nitreux, l'apparition de l'anneau bleu (*réaction limite de Gilbert-Herscher-Posternak*) correspond toujours à une concentration fixe et définie de ce pigment χ et que, d'autre part, dans un sérum sanguin très riche en pigments biliaires, la dilution progressivement croissante atténue l'intensité de la réaction de Gmelin ; que cette réaction, à un moment donné, n'est représentée que par un anneau bleu léger, semblable au précédent, et au-delà demeure négative, l'acide nitrique ne produisant plus le moindre liseré coloré.

Lorsque, dans un sérum sanguin naturel ou dilué, apparaît l'anneau bleu, limite de la réaction de Gmelin, on est en droit de supposer qu'à ce moment la teneur de ce liquide en bilirubine atteint ou est voisine de la concentration χ, évaluée précédemment, avec une très grande approximation, à 1 p. 40 000, pour un tube d'un centimètre de diamètre. Dans ces conditions, il suffit de connaître la quantité du sérum initial et celle du sérum artificiel contenues dans le mélange pour pouvoir facile-

ment calculer la quantité de bilirubine renfermée dans le premier.

De là découle le procédé de dosage de la bilirubine dans le sérum sanguin ou la *cholémimétrie* que nous nous proposons d'exposer dans ce chapitre. Ce procédé est très simple, de beaucoup plus sensible que ceux connus jusqu'à ce jour, applicable à tous les sérums dont la concentration en bilirubine dépasse ⅞, applicable également à d'autres liquides organiques, tels que la bile ou l'urine, nécessitant seulement une instrumentation et des réactifs peu compliqués et à la portée de tout le monde.

Nous exposerons la marche à suivre pour pratiquer la cholémimétrie d'après cette méthode, telle qu'elle est décrite par MM. Gilbert, Herscher et Posternak dans leur communication à la Société de Biologie de Paris (séance du 12 Décembre 1903) et exécutée journellement dans le laboratoire de l'hôpital Broussais. Nous décrirons la prise du sang et la récolte du sérum, nous indiquerons l'instrumentation et les réactifs nécessaires pour le dosage, nous passerons ensuite à la technique même de l'opération et nous montrerons, par quelques exemples, la façon dont on peut calculer la teneur en bilirubine d'un sérum sanguin.

Prise du sang. Récolte du sérum. — Pour recueillir du sang, il n'est point nécessaire de recourir au procédé de MM. Widal et Sicard qui aspirent du sang d'une veine à l'aide d'une seringue. Ce procédé est assez délicat pour l'opérateur et n'est peut-être pas exempt de tout danger pour le malade.

Il est préférable aussi de ne pas se servir de ventouses scarifiées ; cette technique est défectueuse parce que, comme le fait observer M. le Professeur Hayem, dans ces conditions, le sang est toujours agité et il se coagule d'une manière successive. Puis, les ventouses contiennent forcément de la vapeur d'eau, ce qui est un gros inconvénient puisque cette dernière, grâce à son action dissolvante sur les globules rouges, met en liberté une certaine quantité d'hémoglobine. Enfin, les ventouses présentant une large surface d'évaporation, le sérum se concentre et si l'on veut éviter cette évaporation, on doit recourir au bouchage soigneux, ce qui ne peut pas être fait sans agiter le sang. Tout cela rend le sérum, récolté au moyen de ventouses, plus teinté qu'il ne devrait être en réalité.

Il est plus simple d'avoir recours à la technique recommandée par M. le Professeur Hayem depuis 1885, quand, au Congrès de Grenoble, il a appelé l'attention sur l'utilité d'examiner le sérum sanguin.

Voici comment il procède :

Le doigt étant préalablement aseptisé : lavé au savon, à l'alcool ou à l'éther et avec une solution antiseptique, puis séché, on fait une piqûre de la pulpe digitale (de l'annulaire ou du médius en général) avec une lancette flambée et l'on recueille le sang qui s'écoule de la plaie goutte à goutte dans une éprouvette d'une contenance de 2 cent. cubes, 5 à 3 cent. cubes, rigoureusement propre et sèche. M. le Professeur Hayem conseille de la passer dans une solution de potasse ou de soude caustique à 40 p. 100, puis laver et sécher à l'éther.

Cette technique simple et facile comporte néanmoins quelques détails, que nous allons indiquer, et sur lesquels M. le Professeur Hayem insiste à juste titre. Avant de pratiquer la piqûre, il est utile de laisser pendant quelques instants le membre dans une position déclive. Si l'écoulement se fait trop lentement, on peut le faciliter en pressant sur les parties latérales du doigt piqué. En général, de 2 à 10 minutes, suivant la plus ou moins grande rapidité de l'écoulement, on a une quantité de sang suffisante, c'est-à-dire 2 à 3 centimètres cubes, et même davantage, et il est exceptionnel que l'écoulement par trop lent oblige à recourir à la ligature du bras. Une précaution très importante, pour empêcher le laquage du sérum, est d'éviter que le sang tombe sur les parois de l'éprouvette; il faut, par conséquent, que le diamètre de l'éprouvette soit suffisant, et l'on doit tenir celle-ci bien dans l'axe du doigt, de façon que le sang qui s'écoule tombe directement au fond du vase.

Une fois la quantité de sang nécessaire obtenue, on bouche l'éprouvette et on la laisse au repos, en attendant la coagulation du sang et la formation du caillot.

La formation du caillot, sa rétraction et la séparation du sérum nécessitant généralement de 12 à 18 heures suivant les individus, on dépose l'éprouvette remplie de sang dans un lieu frais pour 24 heures. En hiver, on peut se contenter de maintenir l'éprouvette au repos dans une pièce peu chauffée, mais, en été, il est indispensable de la mettre dans une petite glacière; autrement on risque avoir un sérum louche, grâce au développement de divers protoorganismes.

Le lendemain, on procède à la décantation du sérum. On l'aspire doucement avec une pipette effilée, en ayant soin de ne pas toucher le caillot, et on le place dans une autre éprouvette rigoureusement propre et soigneusement séchée ; on entraîne forcément quelques globules rouges, mais leur proportion est très minime, et, par le repos, ils tombent au fond du vase.

La quantité de sérum étant directement proportionnelle au degré de rétractilité du caillot et inversement proportionnelle à son volume, avec 2 à 3 centimètres cubes de sang, on a la plupart du temps une quantité suffisante de sérum pour pratiquer la cholémimétrie.

Cholémimétre. — Dans la construction de l'appareil destiné au dosage de la bilirubine dans le sérum, on a été guidé par le désir de déterminer avec le plus de précision possible la dilution du sérum à doser dans le sérum albumineux artificiel. Le cholémimètre se compose d'un certain nombre de pipettes graduées, de tubes cylindriques à fond plat mesurant exactement 1 centimètre de diamètre, d'un support pouvant recevoir six tubes de ce modèle et d'un agitateur.

Pipettes. — Le cholémimètre en comporte trois. Elles sont en verre de Bohème, exactement calibrées et graduées. Pour faciliter la mesure exacte, on a choisi un calibre de 3 millimètres, le bout de la pipette a été soigneusement effilé, de façon qu'on puisse obtenir à peu près 50 à 55 gouttes par centimètre cube. De la sorte, l'écoulement est très lent et l'on arrive facilement à mesurer exactement 1/20 de cent. cube.

La première de ces pipettes (fig. 1), désignée par les

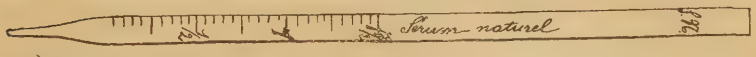

Fig. 1. Pipette pour le sérum naturel (1/2 grandeur naturelle)

initiales SN (sérum naturel), a une contenance de 1 cc, 5 ; elle est graduée avec précision en vingtièmes de cent. cube et sert à mesurer les volumes du sérum sanguin dont on cherche à doser la teneur en bilirubine.

La seconde pipette (fig. 2), portant l'inscription

Fig. 2. — Pipette pour le sérum artificiel (1/2 grandeur naturelle).

SA (sérum artificiel), de 2 cent. cubes, graduée au quart de cent. cube est destinée à mesurer exactement et à distribuer dans les tubes le sérum albumineux artificiel servant à diluer le sérum à examiner. Comme on le voit sur la fig. 2, le quart supérieur de la pipette est subdivisé en dix parties et cela dans le but de mesurer avec précision le sérum artificiel dans les cas où le sérum à examiner est pauvre en bilirubine ; nous reviendrons sur ce point dans la suite de notre description.

Enfin, la troisième pipette (fig. 3), RN (réactif nitrique),

Fig. 3. — Pipette pour le réactif nitrique (1/2 grandeur naturelle).

à effilure plus longue, permettant de mesurer approximativement 0 cc, 25, sert à déposer le réactif nitrique.

Tubes. — Les tubes destinés à recevoir les mélanges du sérum artificiel et du sérum à doser, sur lesquels on pratique la réaction de Gmelin, sont des tubes cylindriques, à fond plat, également en verre de Bohème ; ils ont exactement 1 centimètre de diamètre. Il est utile

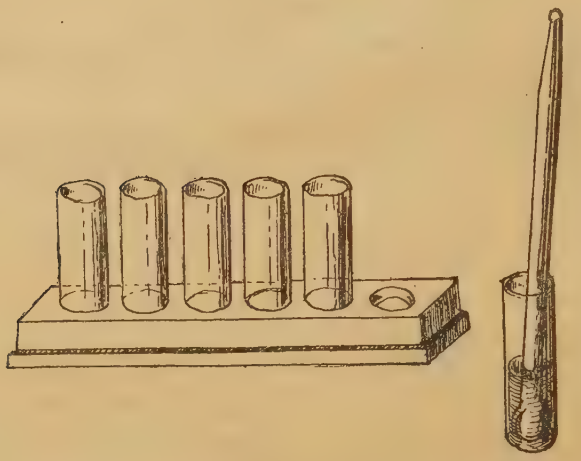

Fig. 4. — Support pour recevoir les tubes, dont un, rempli à moitié de liquide, est sorti et contient l'agitateur.

d'en avoir un certain nombre : une douzaine à une douzaine et demie.

Accessoires. — Sous cette rubrique, nous comprenons le support pour recevoir les tubes et l'agitateur. Dans le modèle de cholémimètre adopté par les auteurs de la méthode, ce support est en verre dépoli, ce qui permet des inscriptions servant de points de repère ; il présente, comme on le voit sur la fig. 4, six trous pour recevoir six tubes à la fois.

Pour rendre homogènes les dilutions de sérum à doser

dans le sérum albumineux artificiel, il est utile d'avoir une petite palette en verre pouvant servir d'agitateur.

Pour être complet, nous devrions mentionner qu'on a besoin de deux flacons pour conserver les réactifs, mais la question des flacons importe peu pourvu qu'on puisse les boucher soigneusement.

Réactifs. — Les réactifs nécessaires pour le dosage de la bilirubine dans le sérum sanguin sont : le sérum albumineux artificiel et le réactif de Gmelin dilué.

Sérum albumineux artificiel :

Blancs d'œufs..... .... } *a â.*
Eau salée à 15 p. 1000..... .... }
Soude caustique. .... 5 p. 1000.

Les blancs d'œufs frais, additionnés d'un volume égal d'eau salée à 15 p. 1000, sont battus et laissés au repos pendant 24 heures. Les membranes restent agglomérées sur les parois du vase et le liquide se collecte dans le fond. On décante le lendemain ce liquide et on l'additionne de soude caustique dans la proportion de 5 p. 1000. Ainsi préparé, ce sérum doit être laissé au repos pendant trois ou quatre jours. Pendant ce temps, il se forme un précipité qui entraîne en partie les matières colorantes du blanc d'œuf ; le liquide surnageant se clarifie et se fluidifie. Ce milieu se rapprochant beaucoup du sérum sanguin par sa fluidité, sa teneur en albumine et son alcalinité paraît complètement incolore, comme nous l'avons vu précédemment, sous une épaisseur de 1 centimètre. Assez souvent, le sérum, ainsi préparé, se

gélifie quelques minutes après l'adjonction de la soude. La formation du précipité et la liquéfaction du sérum peut ne s'observer, alors, qu'au bout de 8 à 15 jours. Ce sérum doit être conservé au frais et ne peut servir plus d'un mois, surtout en été, parce qu'au bout de ce temps, en général, sa coagulation par l'acide nitrique devient moins dense, à cause de la dégradation de la molécule albuminoïde, l'acide nitrique diffuse trop rapidement dans le coagulum et les anneaux deviennent moins nets.

Réactif nitrique nitreux dilué :

Acide nitrique pur à 36°.....	200 cent. cubes.
Eau distillée.....	100 —
Nitrite de soude.....	0 gr. 06

Une telle composition augmente la sensibilité de la réaction de Gmelin dans les milieux albumineux. Le flacon doit être soigneusement bouché, sinon l'acide nitreux abandonne la solution et le réactif perd de sa puissance. Une quantité plus grande de nitrite de soude agit dans le même sens.

Technique de l'opération. — Les tubes cylindriques de 1 centimètre de diamètre étant soigneusement lavés, puis séchés et fixés sur le support approprié, au nombre de six en général, on commence par distribuer avec la pipette SA exactement 0 cc, 5 de sérum albumineux artificiel dans chaque tube ; la pipette SA, pour éviter son obstruction, doit être lavée avec soin à l'eau distillée chaque fois qu'on s'en est servi.

Ceci fait, on procède à la dilution du sérum sanguin

dont il s'agit de doser la teneur en bilirubine. Pour cela, on ajoute, avec la pipette SN, des quantités croissantes de sérum à doser au demi centimètre cube de sérum albumineux artificiel déposé dans chaque tube : une division (1/20 de centimètre cube) dans le premier tube, deux divisions dans le deuxième et ainsi de suite. Puis on agite avec la petite palette en verre le mélange de chaque tube en commençant par celui où l'on a mis le moins de sérum sanguin. Il ne reste alors qu'à déposer le réactif de Gmelin : on aspire par la pipette RN une certaine quantité d'acide nitrique nitreux et, après avoir soigneusement essuyé l'extrémité de la pipette, on dépose, avec précaution, au fond de chaque tube, un quart de centimètre cube du réactif, sans oublier d'essuyer l'extrémité de la pipette après l'avoir plongée dans chacun des tubes.

Manière d'observer l'anneau bleu limite. — La réaction ne se produit pas instantanément et pour la juger, définitivement et en toute sécurité, il faut laisser les tubes au repos et attendre de 20 minutes à une demi-heure. Au bout de ce temps, on procède à l'examen du caillot albumineux et à la recherche de l'anneau bleu caractéristique de la réaction limite. Cet examen exige naturellement de la part de l'observateur une certaine accoutumance, une éducation particulière de l'œil, ce qui d'ailleurs, s'acquiert assez facilement.

Pour bien juger de la présence de l'anneau bleu limite il faut examiner en plein jour, à l'abri des rayons directs du soleil, le dos à la lumière et l'œil regardant le premier, le deuxième tube, etc., sous un angle de 45°.

Calcul de la teneur en bilirubine du sérum dosé. — Nous venons d'exposer la technique générale de la cholémimétrie. En pratique, la concentration de la bilirubine dans les différents sérums étant très variable, comme leur coloration, cette technique présentera nécessairement de légères modifications suivant que le sérum à doser sera hypoteinté, normalement coloré ou hyperteinté. Prenons, pour nous expliquer, les cas qui peuvent se présenter en clinique.

Quand on cherche à déterminer la teneur en bilirubine d'un sérum qui n'est pas trop coloré, la technique doit être celle que nous venons de décrire. On distribue dans les tubes fixés sur le support exactement 0cc, 5 de sérum artificiel, on ajoute des quantités croissantes de sérum à doser : 1/20 de centimètre cube dans le premier tube, 2/20 dans le deuxième, etc. et l'on agite. Ensuite on dépose l'acide nitrique. Dans ces conditions, si l'on examine les tubes après une demi-heure de repos, l'un après l'autre et de la façon que nous avons indiquée, on constate que la réaction reste négative dans les premiers tubes (où l'on a ajouté le moins de sérum à doser), puis, dans l'un des suivants, apparaît un anneau bleu léger, mais net ; au-delà, le Gmelin est plus intense.

Ici, deux cas peuvent se présenter : le premier anneau bleu, limite de réaction, est très léger ou trop intense.

Si ce premier anneau est très léger, on considère que la concentration de la bilirubine atteint, ou est très voisine, dans le tube correspondant, de la limite χ. Pour calculer la teneur en bilirubine du sérum initial, qu'on cherche à doser, on est, par conséquent, en présence des données suivantes : la constante χ, qui est évaluée à

1/40000, le 1/2 centimètre cube de sérum albumineux ayant servi à la dilution du sérum initial, enfin le nombre a de vingtièmes de centimètre cube de sérum sanguin ajoutés dans le tube où l'on a observé la réaction limite. Par un raisonnement des plus simples, on peut obtenir x ou la concentration cherchée. En effet, en désignant par x la concentration en bilirubine du sérum initial, dont on a employé a vingtièmes de centimèbre cube, la quantité de bilirubine dans le tube présentant la limite de la réaction sera égale à ax ; le volume de liquide contenu dans ce même tube est 0cc, 5 $+ a$ ou 10 divisions $+ a$ divisions $= 10 + a$; pour avoir la concentration du mélange du tube en question, on n'a qu'à diviser la quantité de bilirubine qu'il renferme, c'est-à-dire ax par le volume total du mélange, c'est-à-dire par $10 + a$, on aura $\frac{ax}{10 + a}$; mais, d'autre part, cette même concentration est égale χ. On a donc l'équation :

$$\frac{ax}{10 + a} = \chi$$

$$\text{d'où } x = \frac{10 + a}{a} \cdot \chi = \frac{10 + a}{a} \cdot \frac{1}{40000};$$

Il suffit de noter la valeur de a, c'est-à-dire le nombre de vingtièmes de centimètre cube du sérum à doser ajoutés dans le tube limite ou le numéro de ce tube, comme le disent par abréviation les auteurs de la méthode, pour calculer la valeur x ou la concentration du sérum initial. Par exemple, au cas où a égale 5, on a $x = 3\,\chi = \frac{1}{13333}$; au cas où a égale 2, on a $x = 6\,\chi$ $\frac{1}{6666}$, etc.

Si la première réaction obtenue est trop intense, si la concentration dans le tube correspondant dépasse par conséquent la limite $\frac{1}{x}$, le tube précédent présentant une réaction négative, on fait la moyenne entre l'x de ces deux tubes. Les résultats sont ainsi plus précis.

Pour simplifier les choses et éviter les calculs, les auteurs de la méthode ont dressé le tableau ci-dessous, permettant de lire directement la concentration (1).

NUMÉROS du tube.	CONCENTRATION relative de la bilirubine.	CONCENTRATION absolue de la bilirubine (en chiffres ronds).
0,25	41,0 %	1/975
0,375	27,1	1/1290
0,50	21,0	1/1900
0,75	14,1	1/2800
1	11,0	1/3600
2	6,0	1/6700
3	4,3	1/9200
4	3,5	1/11400
5	3,0	1/13300
6	2,7	1/15000
7	2,4	1/16500
8	2,25	1/17800
9	2,11	1/18900
10	2,00	1/20000
12	1,83	1/21800
14	1,71	1/23300
16	1,62	1/24600
18	1,55	1/25700
20	1,50	1/26700
25	1,40	1/28600
30	1,33	1/30000
35	1,29	1/31100
40	1,25	1/32000
60	1,17	1/34300

(1) Dans le tableau, les résultats sont appréciés en chiffres absolus et par comparaison avec la concentration $\frac{1}{x}$. Cette dernière annotation est peut-être plus rigoureuse, car, étant donnée la difficulté d'obtenir de la bilirubine chimiquement pure, nous ne saurions considérer comme absolument exact le chiffre 1/40000. Il s'agit seulement d'une approximation, mais d'une approximation assez grande, et, en tout cas, suffisante pour la clinique. (Note des auteurs).

Dans ce tableau chaque tube est désigné par un numéro correspondant au nombre de vingtièmes de centimètre cube de sérum à doser, ajoutés à 0cc, 5 de sérum albumineux artificiel.

Cette dernière quantité est, d'ailleurs, susceptible de varier. Il faudra seulement que l'ensemble du mélange atteigne ou dépasse 0cc, 5, quantité minima nécessaire pour observer la réaction. De sorte que, pour obtenir le N° 10, par exemple, on pourra prendre 0cc, 25 de sérum artificiel et ajouter 5 divisions de sérum à doser. L'importance de ce fait ressort encore mieux si l'on suppose le cas du N° 40. Quarante vingtièmes de cent. cube, ou, autrement dit, 2 cent. cubes représentent déjà une quantité considérable de sérum, dont on ne dispose pas toujours en clinique ; mais, dans ce cas, on peut tourner la difficulté et n'ajouter que 8 vingtièmes de cent. cube de sérum sanguin à 2 vingtièmes de sérum artificiel, ce qui fera en tout un mélange de 0cc, 5. Il est utile, par conséquent, que la pipette SA, comme on le voit sur la fig. 2, soit subdivisée, dans son quart supérieur, en dix parties : cela précisément, comme nous l'avons dit précédemment, dans le but de doser les sérums pauvres en bilirubine.

De même, s'il s'agit d'un sérum très coloré, comme dans les cas de cholémie intense, cette quantité de 0cc, 5 doit nécessairement varier; car, en suivant la technique indiquée pour les sérums moyennement colorés, on n'obtiendra aucun résultat, la réaction étant déjà supérieure à la limite dans le premier tube. Il est donc de toute nécessité de diluer davantage le sérum à doser, pour obtenir la limite de la réaction, et d'ajouter un

vingtième de cent. cube de sérum hypercoloré à 0cc, 75, 1 cent. cube, 1cc, 5, 2 cent. cubes de sérum artificiel, suivant les cas. C'est pourquoi, dans le tableau ci-dessus qui indique, nous le rappelons encore une fois, le nombre de vingtièmes de cent. cube ajouté au demi cent. cube de sérum artificiel, les auteurs de la méthode font précéder le N° 1 des N^{os} 0,75 ; 0,50 ; 0,375 ; 0,25.

Il ne nous reste plus qu'une remarque à faire, relative au numéro du tube par lequel il faut commencer le dosage si l'on veut avoir un résultat rapide et précis sans gaspiller un sérum dont on ne possède souvent qu'une quantité moyenne.

Par exemple, en ce qui concerne les sérums hypoteintés, il est inutile de commencer par en ajouter 1/20 de cent. cube à 0cc, 5 de sérum artificiel, c'est-à-dire par le N° 1, puisque la réaction sera forcément négative dans ce tube. L'essentiel est d'avoir trois tubes dans lesquels la réaction est successivement inférieure, égale et supérieure à la limite. Il suffit d'une certaine habitude pour juger immédiatement d'une manière approximative à quel degré de dilution celle-ci apparaîtra. On n'a plus alors qu'à faire cinq à six mélanges se rapprochant de cette dernière pour obtenir le résultat.

On peut aussi omettre un à plusieurs tubes, quitte à compléter l'intervalle pour préciser davantage.

Si l'on compare dans le tableau ci-dessus les chiffres de concentration des sérums donnant la réaction limite entre les N^{os} 0,25 et 1, on voit que l'écart présenté par ces chiffres est très sensible. Tandis que les chiffres des N^{os} 10 et 9 diffèrent seulement de 0,11 %, entre les N^{os} 0,75 et 0,50, on trouve un écart de 6,9 % et du N° 0,50 au

N° 0,375 cette même différence s'élève à 7,1 %. Les résultats deviennent donc moins précis à mesure que la concentration s'élève.

Il est avantageux par conséquent de diluer les sérums trop concentrés avec 10 à 5 volumes de sérum artificiel, de doser la bilirubine dans ce mélange et de multiplier le chiffre obtenu par le nombre plus un de volumes de sérum artificiel ajoutés. Les résultats se rapprochent ainsi davantage de la vérité.

Prenons, par exemple, un sérum, dont la concentration est de 1/1400. Si nous lui appliquons la méthode générale, nous voyons que la réaction limite est dans le tube N° 0,375. Le tableau nous indique que la teneur en bilirubine de ce sérum doit être exprimée par la fraction 1/1290, différant sensiblement de la teneur réelle.

Mais, si nous mélangeons notre sérum à 9 volumes de sérum artificiel et si nous dosons alors la bilirubine, le tube limite se trouve placé entre les N^{os} 5 et 6 et le tableau nous donne la fraction 1/14150. En multipliant cette concentration par 10, nous obtenons le chiffre 1/1415 qui exprime très exactement la teneur réelle en bilirubine du sérum en question.

CHAPITRE VII

Importance de la cholémimétrie.

Ce chapitre est forcément un peu prématuré puisque la méthode étudiée par nous est de date récente et n'a pas encore permis d'approfondir les nombreux problèmes se rattachant à la pathologie hépatique. Nous ne pouvons, par conséquent, nous étendre longuement sur ses résultats. Mais, pour récente qu'elle soit, cette méthode a permis déjà à ses auteurs de doser la bilirubine, non seulement dans le sérum sanguin, mais aussi dans la bile et l'urine, et d'enregistrer quelques faits très importants, dont nous croyons devoir dire quelques mots.

En 1903, MM. Gilbert, Lereboullet et Mlle Stein ont entrepris une série de recherches à la Clinique Baudelocque pour étudier comparativement, au moment de l'accouchement, le sérum sanguin de la mère, celui du nouveau-né et celui du sang du cordon prélevé lors de sa section. L'examen physique et l'intensité de la réaction de Gmelin ayant montré le caractère nettement bilieux du sang du cordon par rapport à celui de la mère, ces auteurs ont jugé nécessaire de pousser plus loin l'étude comparative de la teneur en bilirubine de ces sérums. Ils ont recouru, avec le concours de MM. Herscher et Posternak, à la cholémimétrie et ont

déterminé la quantité de bilirubine contenue dans chaque échantillon de sérum examiné. Les résultats obtenus par ces auteurs sont consignés dans leur communication à la Société de Biologie de Paris (séance du 27 Juin 1903) et dans la thèse de M^lle^ Stein (Paris, 1903).

Les chiffres rapportés dans ces travaux démontrent qu'en moyenne (neuf observations) la teneur en bilirubine du sérum maternel est d'environ 1 p. 33 000 et celle du sérum du sang du cordon d'environ 1 p. 10 000, c'est-à-dire trois fois plus grande. Dans deux de ces cas, il était possible (1) de déterminer la proportion de bilirubine contenue dans le sérum du nouveau-né (2) et on l'a trouvée égale à 1 p. 6 350 dans les deux cas, c'est-à-dire d'un tiers plus forte que celle du sérum funiculaire, elle-même trois fois plus marquée que celle du sang maternel.

Ces chiffres, encore trop peu nombreux pour avoir une valeur absolue, permettent néanmoins de corriger une vieille erreur datant de Chevreul, qui considérait le sang du nouveau-né comme normalement incolore, et de formuler quelques déductions importantes, esquissées dans la même communication.

D'une part, ces faits prouvent l'activité de la fonction biliaire chez le nouveau-né et démontrent l'existence, chez lui, d'une *cholémie physiologique* particulièrement intense, égalant ou dépassant celle de nombreux ictériques adultes. Cette cholémie du nouveau-né et, vraisem-

(1) L'appréciation de la tenneur en bilirubine du sérum du sang du nouveau-né est souvent impossible en raison de la grande facilité avec laquelle ce sérum se teinte secondairement d'une très grande quantité d'hémoglobine.

(2) Ces nouveau-nés n'étaient, ni ne sont devenus ictériques.

blablement celle du fœtus dans les derniers mois de la vie intra-utérine, est en général remarquablement bien tolérée et n'entraîne aucun trouble ; elle ne s'accompagne ordinairement ni de cholurie, ni même d'urobilinurie. On peut se demander s'il ne faut pas rattacher à cette cholémie du nouveau-né et sa teinte spéciale et le léger ictère observé si souvent chez lui.

D'autre part, il découle de ces chiffres, que la cholémie fœtale est supérieure à celle constatée dans le sang du cordon, représenté surtout par le sang de la veine ombilicale. Il est évident, par conséquent, que le sang fœtal abandonne au niveau du placenta une partie des pigments biliaires qu'il renferme au sang maternel (1) et qu'il y a donc une *cholémie maternelle d'origine fœtale*. Cette cholémie maternelle reste ordinairement peu intense parce que, d'une part, la quantité de pigments biliaires apportée par le fœtus, considérable pour lui, est insignifiante pour l'organisme maternel, d'autre part, ces pigments peuvent être rejetés incessamment. Néanmoins, cette cholémie, quoique peu intense, en se surajoutant à la cholémie physiologique et parfois à la cholémie pathologique de la mère, peut entraîner diverses conséquences. Ainsi, les pigmentations gravidiques semblant en rapport avec la cholémie pathologique de la femme enceinte peuvent être, en partie, dues au passage des pigments biliaires du fœtus dans le sang de la mère. L'urobilinurie des femmes enceintes, loin de témoigner de la mort du fœtus, comme on l'a affirmé, pourrait, au contraire, être un indice de sa vitalité.

(1) Cette élimination doit même être considérée comme très importante chez le fœtus, parce que l'élimination urinaire fait défaut chez lui et l'élimination intestinale est relativement minime.

Mais là ne se bornent pas les acquisitions de la cholémimétrie ; elle a rendu d'autres services, tantôt d'une manière indirecte, tantôt directement.

Des recherches de MM. Gilbert, Herscher et Posternak, déjà publiées en partie et dont nous avons parlé précédemment, il résulte que le sérum de l'homme renferme à l'état normal des pigments biliaires, de même, d'ailleurs, que celui de divers animaux. Ces pigments sont très peu abondants dans le sang de l'homme sain et seules les recherches précises qui ont précédé l'établissement de la technique cholémimétrique ont permis d'en reconnaître la présence.

Il existe donc, à l'instar de la glycémie physiologique, une *cholémie physiologique*. L'homme sain présente un véritable ictère léger, un ictère acholurique, caractérisé par la présence d'une faible quantité de pigments biliaires dans le sang — fait important, qui pourrait expliquer la coloration normale des téguments et la présence dans l'urine du chromogène de l'urobiline (urobiline réduite de Disqué).

Cet ictère acholurique physiologique n'est qu'ébauche de l'ictère acholurique pathologique dont nous devons dire quelques mots avant de terminer ce chapitre.

Grâce aux travaux de MM. Gilbert et Herscher, la physiologie pathologique de l'ictère hémaphéique de Gubler et de notre regretté maître Dreyfus-Brisac est entièrement élucidée et la classification des ictères a reçu enfin des bases solides. MM. Gilbert et Herscher ont démontré qu'il n'y a qu'un ictère, qu'il est toujours biliphéïque et que son polymorphisme clinique dépend de l'intensité de la cholémie et de l'état des urines.

Les urines des ictériques tantôt contiennent des

pigments biliaires, tantôt en sont dépourvues, d'où une première division des *ictères* en *choluriques* et *acholuriques*. Le taux de la diurèse quotidienne sert de base pour classer les formes cliniques des ictères acholuriques, qui sont au nombre de trois : l'*ictère acholurique avec oligurie* (ancien ictère hémaphéique de Gubler, ictère urobilinique des allemands, ictère polypigmentaire de Hayem), l'*ictère acholurique avec diurèse normale* et l'*ictère acholurique avec polyurie*.

La cholériminétrie appliquée à l'étude de ces différentes variétés de l'ictère a permis déjà à M. le professeur Gilbert et à ses élèves d'établir quelques points intéressants.

La plus forte proportion de bilirubine observée dans le sérum des malades atteints d'ictères intenses n'a pas dépassé jusqu'ici 1 p. 900, c'est-à-dire que cette proportion, quoique voisine du chiffre présenté par la bile pure, lui est toujours inférieure.

Tout récemment, il a été établi que la teneur en bilirubine du sérum au cours de l'ictère acholurique de la néphrite interstitielle est de 1 p. 21 000 (Thèse de Devaux, 1904) et l'on pourra bientôt déterminer à quel degré de cholémie correspondent, le plus souvent, l'ictère cholurique et les diverses variétés d'ictère acholurique et quelle est la teneur en bilirubine du sérum dans les diverses maladies.

Ainsi, non seulement nous sommes bien loin de l'époque où Deyeux (Thèse de Paris, 1804) trouvait que le principe jaune de la sérosité du sang des ictériques n'a pas la saveur ni l'odeur de la bile, mais nous approchons du moment où l'on pourra résoudre d'une façon suffisamment précise les divers problèmes relatifs à l'intensité de la cholémie.

CONCLUSIONS

1) La réaction de Gmelin, caractéristique de la présence de la bilirubine, consiste, quand on opère sur un liquide non albumineux, dans l'ensemble et la succession des anneaux colorés décrits par Gmelin et Frerichs.

2) Cette même réaction, pratiquée dans un milieu albumineux, est sensiblement différente et se présente avec les particularités suivantes :

a) La série des anneaux colorés de Gmelin n'apparaît dans les milieux riches en albumine sous l'influence de l'acide nitrique que si la teneur en bilirubine de ces milieux atteint ou dépasse une certaine concentration : 1 p. 3 500 sous une épaisseur de 1 centimètre.

b) Au-dessous de ce chiffre, l'aspect de la réaction de Gmelin varie suivant la concentration de la bilirubine : avec 1 p. 7 000, on a un liseré bleu à reflet verdâtre (*Réaction de Hayem*) ; au-dessous de 1 p. 11 000 on obtient un anneau bleu à reflet violet (Gilbert-Herscher-Posternak).

c) La concentration 1 p. 40 000 correspond à la limite de la réaction de Gmelin, qui demeure négative au-dessous de ce chiffre.

3) Les anneaux bleu à reflet verdâtre de Hayem et bleu à reflet violet de Gilbert-Herscher-Posternak, produits par l'acide nitrique dans des milieux albumineux, sont aussi caractéristiques de la présence de la bilirubine que la série des anneaux colorés de Gmelin.

4) Ces mêmes anneaux bleus observés dans certains sérums sanguins doivent être attribués à la présence de la bilirubine et ne sont aucunement dus à d'autres matières colorantes.

5) La fixité de la limite de la réaction de Gmelin permet d'évaluer la teneur en bilirubine du sérum sanguin et constitue la base du procédé de la cholémimétrie de Gilbert-Herscher-Posternak.

6) Dans ce procédé, on dilue le sérum à doser avec des quantités variables, mais définies, d'un sérum artificiel, de façon à obtenir un mélange donnant exactement la réaction de Gmelin limite. Pour obtenir des mélanges suffisamment précis, la dilution se fait par voie volumétrique. Connaissant la quantité de sérum initial renfermée dans le mélange où s'observe la réaction limite, on calcule la teneur en bilirubine du sérum à doser d'après la formule :

$$x = \frac{10 + a}{a} \cdot \chi \cdot$$

où x est la concentration cherchée, a la quantité de sérum initial ajoutée dans le mélange et χ la constante évaluée à 1/40000.

7) Le procédé de cholémimétrie de Gilbert-Herscher-Posternak est facilement applicable en clinique, grâce à sa simplicité, et a permis déjà à ces auteurs d'acquérir un certain nombre de faits importants, relatifs aux variations d'intensité de la cholémie dans les diverses formes d'ictère, dans de nombreuses maladies et même à l'état physiologique.

Il est, en outre, applicable au dosage de la bilirubine dans la plupart des liquides organiques : dans l'ascite et la bile toujours, dans l'urine, le plus souvent.

Vu :
Le Président de la Thèse,
GILBERT.

Vu :
Le Doyen,
DEBOVE.

Vu et permis d'imprimer :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
LIARD.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Arthus. *Eléments de chimie physiologique.* Paris, 1903.

Bein. Ueber den Nachweis der Dotterfarbstoffe, in *Ber. d. d. chem. Gesellsch.*, 1890, t. 23, p. 421.

Berzelius. *Traité de chimie* (trad. fr.), t. VII, p. 179.

Bianchi. *Historia hepatica seu Theoria ac Praxis omnium morborum Hepatis et Bilis.* Genevae, 1725.

Boix. Etude clinique des Ictères, in *Manuel de médecine*, Debove et Achard, VI.

Bernheim. Article Ictère, in *Diction.* Dechambre.

Breschet. Considérations sur une altération organique, in *Journal de physiologie expérimentale de Magendie*, t. I, 1821, p. 354.

Bunge. Lehrbuch der physiol. Chemie. Leipzig, 1898.

Chauffard. Maladies du foie, in *Traité de médecine de* Charcot, Bouchard et Brissaud, t. III, 1892, t. V, 1902 ;

— Séméiologie du foie, in *Traité de pathologie générale* de Bouchard, t. V.

Chevreul. Sur plusieurs points de chimie organique et considérations sur la nature du sang, in *Journal de physiologie expérimentale de Magendie*, t. IV, 1824, p. 126.

Dastre. Art. Bile, in *Dictionn. de physiologie* de Ch. Richet, t. II, fasc. 1.

— et **Floresco**. *Recherches sur les matières colorantes du foie et de la bile et sur le fer hépatique*, Paris, 1899.

Devaux. *De l'ictère acholurique dans la néphrite interstitielle.* Thèse, Paris, 1904.

Deyeux. *Considérations sur le sang des ictériques.* Thèse, Paris, 1804.

Dreyfus-Brisac. *L'ictère hémaphéique principalement au point de vue clinique.* Thèse, Paris, 1878.

Ehrlich Sulfodiazobenzol, ein Reagens auf Bilirubin in *Centralblatt f. Klin. Med.* Leipzig, 1883, p. 721.

Engel et **Moitessier**. *Traité élémentaire de chimie biologique, pathologique et clinique.* Paris, 1897.

Fourcroy. Bile in *La médecine éclairée par les sciences physiques,* 1792, t. III, p. 105.

Frerichs. *Klinik der Leberkrankheiten.* Brunschwig, 1858, p. 105 ou la trad. franç., 1866, p. 102.

Gautier Armand. *Leçons de chimie biologique normale et pathologique* (en collaboration avec Arthus). Paris, 1897.

Gilbert. Séméiologie du sang, in *Traité de pathologie générale* de Bouchard, t. IV.

— Séméiologie du sang, in *Traité de médecine* de Charcot, Bouchard et Brissaud, t. III.

Gilbert et **Carnot.** *Les fonctions hépatiques.* Paris, 1902.

Gilbert et **Fournier.** Maladies du foie, in *Traité de médecine et de thérapeutique* de Brouardel et Gilbert, t. V.

Gilbert et **Herscher.** Sur la diminution de coloration du sérum sanguin. *Société de Biologie* de Paris, s. du 23 novembre 1901.

— — Surcoloration du sérum dans la néphrite interstitielle et dans la ligature expérimentale des uretères, cholémie et ictère d'origine rénale. *Société de Biologie* de Paris, s. du 12 avril 1902.

— — L'ictère hémaphéique, in *Presse médicale,* N° 104, 27 déc. 1902.

— — Les ictères acholuriques, in *Presse médicale,* N° 60, 29 juillet 1903.

— — L'urobilinurie. Origine rénale de l'urobilinurie. L'urobiline est un indice de cholémie, in *Presse Médicale,* N° 71, 3 septembre 1902.

Gilbert, Herscher et **Posternak.** Sur la réaction de Gmelin dans les milieux albumineux. *Société de Biologie* de Paris, s. du 2 mai 1903.

— — — Sur la signification de l'anneau bleu produit par le réactif de Gmelin dans certains sérums (Réaction de Hayem). *Société de Biologie* de Paris, s. du 9 mai 1903.

— — — Sur un procédé de dosage de la bilirubine dans le sérum sanguin (Cholémimétrie). *Société de Biologie* de Paris, séance du 12 décembre 1903.

Gilbert, Lereboullet et **M^lle^ Stein.** Recherches comparatives sur la cholémie physiologique chez la mère et le nouveau-né. *Société de Biologie* de Paris, s. du 27 juin 1903.

Gmelin et **Tiedemann.** *Recherches expérimentales, physiologiques et chimiques sur la digestion,* trad. en franç. par Jourdan. Paris, 1826, p. 79.

Gubler. Analogie d'action de l'acide nitrique sur la bile et sur l'hématoïdine. *Société de Biologie* de Paris, 1859.

Hammarsten. Ein Beitrag zur Kentniss der Menschengalle in *Jahresber. f. Thierchemie,* 1878, t. VIII, p. 263.

Hammarsten. Ueber das Vorkommen von Gallenfarlstoff in dem Blutserum in *Maly's Jahresbericht*, 1878, t. VIII, p. 129.

— *Lehrbuch der physiologischen Chemie.* Wiesbaden, 1899, p. 507.

Halliburton. Note on the Colorings Matter of the serum of certain Birds, in *Journal of physiology*, 1886, t. VII, p. 324.

Hayem. *Congrès de Grenoble*, 1885.

— *Du sang et de ses altérations pathologiques*, Paris, 1887, p. 58.

— *Leçons sur les maladies du sang*, recueillies par MM. Parmentier et Bensaude. Paris, 1900, p. 66.

Hedenius. Methode zum Nachweise der Gallenfartstoffe in ikherischen Flüssigkeiten in (Upsala Läkare förenings 29; 541). *Maly's Jahresbericht*, 1894, p. 385.

Herscher. *Origine rénale de l'urobiline.* Thèse, Paris, 1902.

Historical retrospect on earlier and critical consideration of contemporaneons researches on biliary pigments, in *Ann. Chem. Med.* London, 1879, p. 315.

Jaksch. Ueber eine methode zum Nachweise von kleinen Mengen von Gallenfarbstoff im Blute in *Verhandl. d. Cong. f. inner.* Med. Wiesbaden, 1891, p. 353.

Jolles. Beitrage zur Kentniss der Galle und eine quantitative Methode zur Bestimmung der Bilirubin in der menschlichen und thierischen Galle in *Pflüger's Archiv*, 1894, t. V, p. 1.

Krehl. *Pathologische physiologie.* Leipzig, 1898.

Krokiewicz. i Batko. Nowy odzcynnik na barwiki zölciowe w moczu, in *Przeglad lekarski* Krakow, 1898, p. 65.

Krukenberg. Zur Kentniss der Serum farbstoffe in Sitznngsberichte der Jenaischen Gesellsch. f. Med. und Naturwiss. 1885, p. 29; *Mayl's, Jahresbericht*, 1885, p. 139.

Kühne. *Lehrbuch der physiologischen Chemie.* Leipzig, 1868.

Langhans. Beobachtungen über Resorption der Extravasate und Pigmentbildung in denselben. in *Virchow's Archiv*, 1870, t. 49, p, 66.

Lenoble. *Caractères séméiologiques du caillot et du sérum.* Thèse, Paris, 1898.

Letienne. Recherche des pigments biliaires dans l'urine, in *Médecine moderne*, n° 50, 23 juin 1894.

— *De la bile à l'état pathologique.* Thèse, Paris, 1891.

Mac-Munn. Further researches into the coloringmatters of humor urine with an acount of their artificiel production from bilirubin and from hematin, in *Proced. of the Royal Society of London*, 1881, vol. XXXI, p. 206.

Maly. Untersuchungen über die Gallenfarbstoffe, in *Ann der Chemie*, 163, p. 77 ; *Maly's Jahresbericht*, 1874, p. 232.

— Einige Details über der Gmelinsche Gallenfarbsfoffreaction, in *Sitzb. der Kais. Akad. der Wissenschafle in Wien*, 1869, t. 59, p. 597.

— *Ueber die Dotterpigmente* in *Monatshefte für Chemie*, 1881, t. II, p. 356.

Méhu. *Traité pratique de chimie médicale*, Paris, 1878.

Nencki et **Sieber**. Untersuchungen über den Blutfarbstoff, in *Arch. f. experiment. Pathol. und Pharmak.* 1884, XVIII, p. 401.

Neubauer et **Vogel**. *Anleitung zur qualitativen und quantitativen Analyse des Harnes*. Wiesbaden, 1898.

Nichols. Notes on the reactions and tests of bile pigments in urine and other organic fluids, in *Med. News*, N. Y. 1896, p. 717.

Parmentier. Maladies du sang in *Traité de médecine et de thérapeutique* de Brouardel et Gilbert, t. VI.

Piorrhy et **Lhéritier**. Cholihémie, ictère, jaunisse, morbus regius, in *Traité des altérations du sang* de ces auteurs. Paris, 1840.

Pribram. Eine neue Mothode zur Bestimmung des Kalkes und der Phosphorsäure in Blutserum in *Maly's Jahresbcr.*, 1873, I, p. 107.

Salkowski. *Die Lehre vom Harn.*, Berlin, 1882, p. 245.

— *Practicum der physiolog. med. patholog. Chemie*, Berlin, 1900, p. 183.

Stadelmann. *Der icterus und seine verschiedenen Formen*. Stuttgart, 1891.

— Weitere Beiträge zur Lehre vom Icterus, *in Archiv. f. experiment. Pathologie und Pharmakol.*, 1883, 16, 128.

M^lle Stein. *Cholémie simple familiale et grossesse*. Thèse, Paris, 1903.

Trousseau. Sur un procédé nouveau qui permettrait de reconnaître les urines glycosiques, in *L'Union médicale*, 1863, n° 39, p. 615.

Thudichum. Ueber das Lutein und die Spectrum gelbgefärbter organischen Substanzen, in *Centralblatt f. d. Med. Wiss.*, 1869, t. 7, p. 1.

— On the reaction of some biliary principles, particulary bilirubin with iodine, in *Med. Press.* et Circ. London, 1896, p. 203.

Vernicke. *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, Jena, 1897, p. 585.

TABLE DES MATIÈRES

Pages.

INTRODUCTION..... 5

CHAPITRE I. — **Notions préliminaires sur la bilirubine et ses dérivés**..... 9

CHAPITRE II. — **Procédés de recherches des pigments biliaires dans les liquides organiques** 15

CHAPITRE III. — **Procédés de dosage de la bilirubine.** 21

CHAPITRE IV. — **Particularités de la réaction de Gmelin dans les milieux albumineux**.. 26

CHAPITRE V. — **Signification de la réaction de Hayem dans le sérum sanguin**... 33

CHAPITRE VI. — **Cholémimétrie**,.... 40

CHAPITRE VII. — **Importance de la Cholémimétrie**..... 56

CONCLUSIONS..... 61

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE..... 65

Saint-Brieuc. — Typ. F. GUYON, rue de la Préfecture. — (685-3-4).